

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS

ANTONIO EDUARDO COELHO

EFEITOS DO *Azospirillum brasilense* EM PLANTAS DE MILHO E TRIGO SOB
DÉFICIT HÍDRICO

Curitibanos
2015

ANTONIO EDUARDO COELHO

EFEITOS DO *Azospirillum brasilense* EM PLANTAS DE MILHO E TRIGO SOB
DÉFICIT HÍDRICO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Agronomia do *campus* Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Engenheiro agrônomo.
Orientador: Prof. Dr.Samuel Luiz Fioreze.

Curitibanos
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Antonio Eduardo
EFEITOS DO Azospirillum brasilense EM PLANTAS DE MILHO
E TRIGO SOB DÉFICIT HÍDRICO / Antonio Eduardo Coelho ;
orientador, Samuel Luiz Fioreze - Curitiba, SC, 2015.
40 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitiba. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. bactérias diazotróficas. 3. Zea mays.
4. Triticum aestivum. 5. fixação biológica de nitrogênio. I.
Fioreze, Samuel Luiz . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

ANTÔNIO EDUARDO COELHO

EFEITO DO *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EM PLANTAS DE MILHO E TRIGO SOB DÉFICIT HÍDRICO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Samuel Luiz Fioreze

Data da defesa: 08 de Julho de 2015

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Samuel Luiz Fioreze
Titulação: Doutorado
Área de concentração: em Agricultura
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Ivan Sestari
Titulação: Doutorado
Área de concentração: em Bioquímica e Fisiologia de Plantas
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Jonatas Thiago Piva
Titulação: Doutorado
Área de concentração: em Agronomia
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina
Campus de Curitibanos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida e por ter me dado força e saúde para superar as dificuldades.

A minha mãe pela vida, pela educação, pelas orações, pelos exemplos e pelo esforço para que eu conseguisse cumprir mais essa etapa na minha vida.

A Ivania e a Renata, pelo incentivo, ajuda e apoio.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Samuel Luiz Fioreze, pela convivência, oportunidades, conselhos, incentivo, paciência, atenção, e pelos conhecimentos repassados.

Aos colegas de trabalho e amigos Cláudia, Luiz, Thais, Marcos, Ricardo R., Figueroa, Heverton, Dal Piva, Elaine, que me ajudaram e auxiliaram na montagem, avaliações e coleta de dados. Muito obrigado.

A todos os Professores e colegas que contribuíram de alguma forma em minha formação.

A banca avaliadora, pelas contribuições, pelas críticas e pela disponibilidade.

A toda equipe da UFSC- Campus Curitibanos pela estrutura, ajuda e pela formação profissional.

E à todos que de maneira direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Com objetivo de estudar o acúmulo de biomassa e de nitrogênio em plantas de milho e trigo submetidas à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e déficit hídrico em casa de vegetação, foram realizados dois experimentos em vasos, em cultivo protegido, no ano de 2014. Para os dois experimentos, o delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 3, com quatro repetições. Os fatores foram compostos pela indução ou não do déficit hídrico e três tratamentos aplicados às sementes (inoculação com *A. brasilense*, tratamento com Stimulate e uma testemunha sem tratamento) totalizando 24 vasos. Cada unidade experimental foi composta por um vaso com 3,3 litros, o experimento 1 foi realizado com a cultura do milho (Híbrido simples P30F53) e o experimento 2 com trigo (Cultivar Quartzo). A inoculação de sementes com *A. brasilense* não influenciou o crescimento e tampouco o acúmulo de N em plantas de milho e trigo cultivadas em casa de vegetação, independentemente da disponibilidade de água a que as plantas foram submetidas.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas. *Zea mays*. *Triticum aestivum*. Fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT

With the objective of to study growth and nitrogen accumulation in corn and wheat plants submitted to seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and water stress in greenhouse, two experiments were conducted in pots in glass house, in 2014 year. For both experiments, the experimental design was a randomized block in factorial 2 x 3 design , with four replications. Factors were induction or no of water deficit and three treatments applied to seeds (inoculation with *A. brasilense*, treatment with Stimulate and untreated control) totaling 24 pots. Each experimental unit consisted of a pot with 3.3 liters, the experiment 1 was conducted with the corn crop (P30F53 hybrid) and the experiment 2 with wheat (Quartz cultivar). Inoculation of seeds with *A. brasilense* did not influence growth nor the N accumulation in corn and wheat grown in glasshouse, regardless of the water supply.

Keywords: Diazotrophic bacteria. *Zea mays*. *Triticum aestivum*. Biological nitrogen fixation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estequiometria da reação de fixação biológica de nitrogênio, com ação do complexo enzimático nitrogenase.....16
- Figura 2.** Comparação de médias para os valores de assimilação líquida de carbono (a), condutância estomática(b), concentração interna de CO₂ (c) e transpiração foliar (d), em plantas de milho submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação.....25
- Figura 3.** Comparação de médias para valores de assimilação líquida de carbono (a), condutância estomática (b), concentração interna de CO₂ (c), transpiração foliar (d), em plantas de trigo submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação.....29
- Figura 4.** Comparação de médias para os valores biométricos, volume radicular (a), matéria seca raiz (b), matéria seca colmo (c), matéria seca de folha (d), matéria seca parte aérea (e), matéria seca total (f), em plantas de trigo submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação.....31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância para as trocas gasosas, (valores de f) de plantas de milho, tratadas com stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....24
- Tabela 2.** Resumo da análise de variância (valores de f) para os caracteres biométricos de plantas de milho tratadas com stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....26
- Tabela 3.** Resumo da análise de variância (valores de f) para teores de nitrogênio de plantas de milho tratadas com stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....27
- Tabela 4.** Resumo da análise de variância para as trocas gasosas (valores de f) de plantas de trigo tratadas com stimulate, inoculadas com *A. brasilense* e submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....28
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância (valores de f) para os caracteres biométricos de plantas de trigo, tratadas com stimulate, inoculadas com *a. brasilense* e submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....30
- Tabela 6.** Resumo da análise de variância (valores de f) para teores de nitrogênio, de plantas de trigo, tratadas com stimulate, inoculadas com *a. brasilense* e submetidas à déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.....32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 Objetivo Geral	13
1.2.2 Objetivos Específicos	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	14
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	15
2.3 FIXAÇÃO ASSOCIATIVA DE NITROGÊNIO	16
2.4 <i>Azospirillum brasilense</i>	17
2.5 EFEITOS HORMONAIS DE <i>Azospirillum brasilense</i> EM PLANTAS.....	18
3. MATERIAL E METODOS	20
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
3.2 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	21
3.3 AVALIAÇÕES.....	21
3.3.1 Trocas Gasosas.....	21
3.3.2 Análise Biométrica	22
3.3.3 Teor De Nitrogênio	22
3.4 ANALISE ESTATÍSTICA	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Entre as bactérias associativas diazotróficas, a *Azospirillum brasilense* é a espécie mais estudada. Pesquisas *in vitro* demonstram que o *A. brasilense*, tem a capacidade de fixar biologicamente moléculas de nitrogênio atmosférico em amônia (DOBEREINER; DAY, 1976; DOBEREINER et al., 1976). Também foram encontrados em sobrenadante do cultivo de *A. brasilense*, hormônios vegetais como auxinas, citocininas e giberelinas (BOTTINI et al., 1988; REIS JUNIOR et al., 2004; RADWAN et al., 2005), substâncias essas que segundo Taiz e Zeiger (2010), podem promover o crescimento de plantas.

Uma série de contribuições as plantas são atribuídas, na comunidade científica, à inoculação com *A. brasilense*, sendo essas primárias ou secundárias. Entre os efeitos estão o maior desenvolvimento do sistema radicular, melhor nutrição vegetal, maior concentração de nitrogênio em tecido vegetal, maior capacidade de absorção de água e nutrientes, maior teor de clorofila, maior condutância estomática, incremento no teor de água no apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa e potencial de amenizar fatores estressantes especialmente, estresse hídrico (TIEN et al., 1979; RADWAN et al., 2005; BARASSI et al., 2008; DARTORA et al., 2013; HUERGO, 2008).

Atualmente a inoculação de sementes com *A. brasilense* vem sendo estudada e recomendada para gramíneas no Brasil, especialmente para fornecimento de N. Porém, a real eficiência da interação de *A. brasilense* com plantas ainda não foi comprovada, existindo muita inconsistência dos resultados obtidos com sua utilização. É provável que seus efeitos benéficos sobre as plantas sejam apenas hormonais, os quais levam a planta a absorver melhor os nutrientes e a responderem melhor em condições adversas.

Para a recomendação da inoculação com *Azospirillum* em gramíneas é necessário estudos que demonstrem sua real contribuição e em quais situações esse tem real eficiência, só assim poderemos utilizar essa tecnologia, com um correto posicionamento para obtenção de benefícios agrônômicos. O que evidencia a importância do desenvolvimento de pesquisas avaliando a função e viabilidade da inoculação com *Azospirillum brasilense*.

1.1 JUSTIFICATIVA

Para garantir resultados econômicos significativos nos sistemas de produção de grãos, existe uma crescente necessidade de redução de custos e aumento de produtividade, o que só é possível com um elevado grau de conhecimento técnico científico. Neste contexto, a utilização de microrganismos promotores de crescimento se torna uma importante ferramenta para o aumento da produtividade com um baixo custo.

A bactéria promotora de crescimento *A. brasilense*, demonstra ter potencial em beneficiar seus hospedeiros, contudo existem resultados contraditórios sobre os reais benefícios com sua inoculação em trigo e milho. O que evidencia a importância do desenvolvimento de pesquisas avaliando a função e viabilidade da inoculação com *A. brasilense*.

Portanto, é necessário estudos que demonstrem sua real contribuição e em quais situações esse tem real eficiência. Com isso se comprovado sua eficácia, seja possível posicionar corretamente esta tecnologia para obtenção de benefícios agronômicos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Estudar o acúmulo de biomassa e de nitrogênio em plantas de milho e trigo submetidas à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e déficit hídrico em casa de vegetação.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a contribuição do *A. brasilense* na fixação biológica de nitrogênio.

Estudar interação entre bactérias do gênero *Azospirillum* e plantas de milho e trigo submetidas a estresse hídrico.

Avaliar o acúmulo de biomassa de plantas de milho e trigo em resposta à inoculação de sementes com *A. brasilense*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Bactérias diazotróficas são microrganismos procariotos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Sabe-se que existe uma gama de bactérias capazes de fixar nitrogênio. Baldani e Baldani (2005) destacam que as principais bactérias diazotróficas que tem associação com gramíneas descritas nos últimos cinquenta anos são: bactérias rizosféricas (*Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali*); associativas (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*); e as endofíticas (*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropica*). Moreira (2010), ressalta que existe inúmeros outros grupos de bactérias capazes de fixar nitrogênio e que estas possuem grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, o que garante que bactérias diazotróficas habite os mais diferentes locais.

A maior efetividade no processo de fixação biológica de nitrogênio é observada na simbiose entre bactérias nodulíferas e plantas da família *Leguminosae*. Entre as bactérias diazotrófica e plantas esta é a interação mais evoluída, sendo o processo mais complexo e organizado, o que permite minimizar perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos que interagem na complexidade, heterogeneidade e dinâmica do sistema edáfico (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; HUNGRIA, 2011; MOREIRA et al., 2010). Por exemplo, na cultura da soja, a fixação biológica de nitrogênio é capaz de suprir a necessidade total da cultura, sendo que taxas superiores a 300 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ são observadas no Brasil (HUNGRIA et al., 2007). No entanto, estima-se que o potencial de fixação associativa é de apenas 25 a 50 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ em gramíneas (MOREIRA, 2010; HUERGO, 2008).

Além da fixação biológica de nitrogênio, as bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento de plantas, por mecanismos ainda não completamente esclarecidos, mas associados ao aumento da massa radicular,

nutrição nitrogenada ou aumento da eficiência de absorção de nutrientes no solo, entre outros (RADWAN et al., 2005; MOREIRA, 2010).

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é o macro nutriente mais exigido por gramíneas, sendo um dos principais componente de biomoléculas, como ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Por mais que o nitrogênio represente 78% das moléculas da atmosfera terrestre, este está na forma gasosa, que é inerte (N_2). Para ser absorvido pelas plantas, o N precisa estar na forma iônica (NH_4^+ ou NO_3^{2-}). A reação de redução de N_2 para amônia não ocorre naturalmente, pois requer uma alta concentração de energia, sendo necessário quebrar a tripla ligação entre os átomos de nitrogênio. Na indústria, por exemplo, o processo de transformação de N_2 para síntese de amônia pelo método descrito por Haber e Bosch, emprega temperaturas de 300 a 500 °C, a uma pressão acima de 300 atm (NUNES, 2003; RIBEIRO, 2013).

Existem basicamente duas formas na natureza de quebrar essa tripla ligação, uma é através de descargas da atmosfera, onde o N_2 reage com o oxigênio e é fixado em óxidos de nitrogênio, com o vapor de água são hidratados formando nitrito e através da chuva chega ao solo, porém este processo é pouco efetivo (ROSCOE; MIRANDA, 2013). Outra forma com maior potencial é através da ação da enzima nitrogenase em microrganismos, processo denominado como FBN fixação biológica de nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é dependente do complexo enzimático denominado nitrogenase com a participação de Fe, Mg, Mo e ATP. O complexo enzimático é composto de duas unidades: a dinitrogenase (ou componente I ou Mo-Fe proteína) e a nitrogenase-redutase (também chamada de componente II ou Fe-proteína). No complexo enzimático, as duas unidades interagem cooperativamente durante o processo de FBN. A nitrogenase-redutase, ou Ferro proteína, é responsável pela transferência de elétrons (atuando como doador de elétrons) para que ocorra a redução do N_2 , a dinitrogenase, por sua vez, é a enzima que apresenta o sítio ativo da reação, onde são encontradas condições adequadas para a redução do N_2 . Em resumo, a estequiometria da reação pode ser representada na Figura 1. Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase:

um que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe); outro em que o vanádio (V) substitui o Mo (nitrogenase-2); e um terceiro, que só tem ferro (nitrogenase-3) (NUNES et al., 2003; REIS; TEIXEIRA, 2005; DINIZ, 2011;).

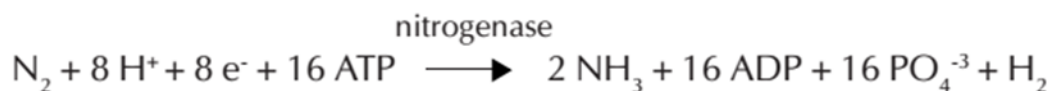


Figura 1. Estequiometria da reação de fixação biológica de nitrogênio, com ação do complexo enzimático nitrogenase. Fonte: REIS; TEIXEIRA, 2005.

2.3 FIXAÇÃO ASSOCIATIVA DE NITROGÊNIO

A fixação associativa de nitrogênio é realizada por diferentes grupos de bactérias, porém esta tem menor contribuição em comparação a simbiose rizóbio-leguminosas, por não ter uma relação tão complexa e organizada quanto a presente nas simbioses entre bactérias nodulíferas (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e outros gêneros recentemente descritos como simbiontes, *Burkholderia*, *Methylobacterium* *Devosia*, *Ochrobactrum* *Phyllobacterium* e *Ralstonia*) com leguminosas, que é resultante de um processo mais evoluído que minimiza perdas do nitrogênio fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos. Estima-se, portanto, que a fixação associativa contribui com 25 a 50 kg de nitrogênio por hectare por ano em gramíneas (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; MOREIRA, 2010; HUERGO, 2008). Entre os fatores que explicam essa menor eficiência, destaca-se o efeito deletério do oxigênio e a inibição por amônio.

A nitrogenase-redutase, ou Ferro proteína em virtude de sua atividade redox, é altamente sensível ao oxigênio, necessitando de condições anaeróbias. Com isso as bactérias diazotróficas precisam regular o suprimento de oxigênio para prover ATP e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase contra o efeito deletério do oxigênio. As bactérias diazotróficas desenvolveram várias estratégias para limitar o acesso do oxigênio à nitrogenase, desde as mais simples como crescimento microaerofílico até modificações morfológicas tais como os nódulos nas leguminosas (REIS; TEIXEIRA, 2005).

A atividade da nitrogenase em vários microrganismos diazotróficos é inibida pela adição de NH_4^+ . Em espécies do gênero *Azospirillum*, a adição de amônia em concentrações variando de 1-10 mM às culturas que fixam nitrogênio, promove um decréscimo da atividade quase que imediatamente para 10% ou menos que a atividade inicial, além de nenhuma nitrogenase ser sintetizada nesta situação (REIS; TEIXEIRA, 2005). Como a FBN realizada pelo *Azospirillum* não tem capacidade de suprir 100% as exigências nutricionais de nitrogênio para culturas como trigo e milho (HUNGRIA, 2011), faz necessário o fornecimento deste por outras fontes (minerais ou orgânicas), porém esta pode inibir a atividade da nitrogenase.

2.4 *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum*, são microrganismos procariotos, gram-negativos, diazotróficos associativos, podendo ser endofíticas facultativas. São encontradas em monocotiledôneas e dicotiledôneas, possuindo versatilidade por ter baixa especificidade em relação à planta hospedeira e as diversas vias metabólicas alternativas que permitem o microrganismo utilizar uma variedade de ácidos orgânicos e aromáticos. Podem ser encontrado no mucigel presente na rizosfera de plantas, caracterizando uma colonização externa das raízes. Na colonização interna, as células de *Azospirillum* podem penetrar nos espaços intercelulares de raízes e lá se alojarem. Podem sobreviver no solo na forma de cistos, o que permite sua sobrevivência mesmo sem planta hospedeira (MOREIRA, 2010; HUNGRIA, 2011).

O gênero *Azospirillum*, é, sem dúvida, o mais estudado entre as bactérias diazotróficas que não formam nódulos quando associadas às plantas. As espécies pertencentes a esse gênero são: *A. lipoferum* e *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. doebereineriae* e *A. largimobile*, esta última é a única espécie desse gênero incapaz de fixar N_2 (RADWAN et al., 2005). A inoculação de sementes com *Azospirillum* vem sendo estudada e recomendada para gramíneas no Brasil, para fornecimento de N. Contudo, a real eficiência da interação da bactéria ainda não foi comprovada, principalmente no que tange à FBN (DIDONET et al. 1996; DIDONET et al. 2000; CAMPOS et al. 1999; GITTI et al. 2012).

De Quadros et al. (2014) observaram que as respostas a inoculação com *A. brasilense*, dependem da cultivar ou híbrido estudados, seus estudos mostraram

que dependendo do genótipo utilizado estes respondem de forma diferente à inoculação, sugerindo que o genótipo da planta desempenha papel importante na colonização pelas bactérias, o que deve estar relacionado com a relação rizosfera bactéria. Faz-se necessários estudos que busquem entender melhor a relação entre bactéria/hospedeiro, com objetivo de melhorar as respostas agronômicas à inoculação.

Algumas bactérias diazotróficas, como é o caso dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* produzem hormônios vegetais, substâncias que reconhecidamente podem promover o crescimento de plantas (TIEN et al., 1979). Hormônios vegetais como auxinas, citocininas e giberelinas foram detectados no sobrenadante do cultivo de bactérias do gênero *Azospirillum*, especialmente *A. brasilense* (BOTTINI et al., 1988; REIS JUNIOR et al., 2004; RADWAN et al., 2005).

Considerando que o *A. brasilense*, produz hormônios vegetais que promovem um maior desenvolvimento do sistema radicular, o que acarreta em uma maior capacidade de absorção de água e nutrientes, não fica claro se os benefícios resultantes da inoculação de sementes com *A. brasilense* em trabalhos a campo (HUNGRIA, 2011) seja oriundos do aumento da superfície radicular que leva a planta a absorver melhor todos os nutrientes, ou da FBN.

2.5 EFEITOS HORMONAIS DE *Azospirillum brasilense* EM PLANTAS

Os estudos sobre interação de bactérias do gênero *Azospirillum* tem tido um foco voltado a fixação biológica de nitrogênio, porém existem evidências crescentes que parte das contribuições destas bactérias associada as plantas devem-se a produção de hormônios vegetais (REIS JUNIOR et al., 2004). Estudos de Tien et al. (1979), verificaram que o maior crescimento radicular em plantas inoculadas com *A. brasilense* foi atribuído a liberação de ácido indol-acético, giberilinas e citocininas. Barassi et al. (2008), relataram em seu trabalho melhores respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, como maior teor de clorofila, maior condutância estomática, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água no apoplasto, maior elasticidade da parede celular e maior produção de biomassa, e atribuiu estas respostas a contribuição hormonal proveniente das bactérias. Em avaliação de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de milho e trigo, Dartora et al.

(2013), atribuíram maior porcentagem de germinação, maior vigor, melhor desenvolvimento inicial das plântulas e maior desenvolvimento radicular à produção de fito hormônios por *A. brasilense*.

Segundo Huergo (2008), *A. brasilense* tem potencial de amenizar uma série de fatores que possam provocar estresse em plantas, devido à produção de fitormônios e antibióticos. A inoculação com *A. brasilense* em cereais e gramíneas, promove maior desenvolvimento do sistema radicular com o aumento da densidade e comprimento de pelos radiculares, aumento do número e volume de raízes laterais, provocando um aumento na absorção de água e nutrientes, por melhorar a exploração radicular do solo pela planta hospedeira. No mesmo trabalho outras alterações fisiológicas são relatadas, como aumento da tolerância das plantas ao estresse hídrico e aumento da respiração radicular através da ativação de enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico, aumento do diâmetro do caule e largura de folhas em milho e aceleração na mobilização de reservas de sementes. Estudos de Bellone e Bellone (2008), identificou maior concentração de jasmonatos, em respostas a inoculação com *Azospirillum* em milho e cana de açúcar, o que reforça os indícios da atuação destas bactérias em situação de estresse.

3. MATERIAL E METODOS

Foram conduzidos dois experimentos, em vasos, em cultivo protegido, no período entre abril e julho de 2014. O estudo foi conduzido na área experimental da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, localizada nas coordenadas geográficas 27°17'12.2" S, 50°31'96.6"O com 1010 metros de altitude.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, esta possuía controle de temperatura e umidade relativa do ar.

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O primeiro experimento foi conduzido com a cultura do milho. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, no esquema fatorial 2 x 3, com quatro repetições. Os fatores foram compostos pela indução ou não do déficit hídrico e três tratamentos aplicados às sementes (inoculação com *Azospirillum brasilense*, tratamento com Stimulate e uma testemunha sem tratamento) totalizando 24 vasos. Cada unidade experimental era composta por um vaso com 3,3 litros, preenchido com vermiculita expandida granulometria media. O material genético de milho avaliado foi o Híbrido simples P30F53 (Pionner®), semeado no dia 16 de abril de 2014.

Para o segundo experimento, utilizou-se a cultura do trigo (Cultivar Quartzo), seguindo os mesmos tratamentos e delineamento experimental do primeiro experimento, a semeadura ocorreu no dia 29 de maio de 2014.

Foi utilizado tratamentos contendo o biorregulador Stimulate®, com objetivo de comparar suas respostas agronômicas com as obtidas através da inoculação com *A. brasilense*. O Stimulate® é o único biorregulador do grupo químico citocinina (0,009%) + giberelina (0,005%) + ácido indolbutírico (0,005%), registrado para a cultura do milho e trigo no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) este é de propriedade da Stoller do Brasil.

3.2 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos em vasos de 3,3 litros. O substrato utilizado no experimento 1 foi vermiculita expandida, este não recebeu adubação. No Experimento 2, o substrato utilizado era composto de areia e vermiculita, na proporção 1:1, com intensão de evitar os sintomas de deficiência nutricional observadas no primeiro experimento foi utilizado como adubação, 3,8 g vaso⁻¹ de superfosfato simples, 1,0 g vaso⁻¹ de cloreto de potássio e 1,5 g vaso⁻¹ de calcário dolomítico.

Para os tratamentos descritos, com a inoculação de *A. brasilense* foi realizada a partir do inoculante comercial Masterfix Gramíneas[®], contendo as estirpes Abv5 e Abv6 da bactéria, na concentração de 100 milhões de células por mL de produto, segundo o fabricante. O intervalo entre a inoculação das sementes e a semeadura foi de 20 minutos. Para os tratamentos com Stimulate[®] foi usado a dosagem recomendada pelo fabricante, sendo que a semeadura ocorreu logo após o tratamento. Após o estabelecimento das plantas, foi realizado desbaste, mantendo-se uma e três plantas por vaso nos experimentos 1 e 2 respectivamente.

A irrigação foi feita igualmente entre os tratamentos, até os 25 dias após emergência para o experimento 2 e até o estágio V4 para os experimentos 1. Em seguida, procedeu-se a suspensão da irrigação para os tratamentos com déficit hídrico, mantendo-se a irrigação adequada nos demais tratamentos, com irrigação diária mantendo o teor de água no substrato em nível de umidade de vaso. O período de déficit hídrico foi de dez dias para o experimento 1 e oito dias para o experimento 2. Após o período de déficit hídrico, as plantas foram coletadas para as avaliações.

3.3 AVALIAÇÕES

3.3.1 Trocas gasosas

Durante o período de suspensão da irrigação (estresse hídrico) foram realizadas medidas das trocas gasosas, com um analisador portátil de gases por infravermelho, modelo LI-6400XT da LI-COR (Lincol, NE) de sistema aberto. As

medidas foram realizadas no período entre 09:00 e 11:00 horas, para obtenção dos valores de assimilação líquida de carbono (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (gs) e concentração interna de carbono (Ci). Na primeira avaliação foi selecionado a última folha totalmente expandida, e a mesma foi utilizadas em todas as demais avaliações.

No Experimento 1 foram realizadas medidas das trocas gasosas aos 0, 2, 4, 6 e 10 dias após a suspensão da irrigação, onde a primeira avaliação foi realizada no dia 11/05/14 e a última no dia 21/05/14. No experimento 2, as medidas foram realizadas aos 0, 4, 6 e 8 dias após o corte da irrigação, onde a primeira avaliação foi realizada no dia 03/07/14 e a última no dia 11/07/14.

3.3.2 Análise Biométrica

A análise biométrica foi realizada após o período de déficit hídrico, onde foi avaliado volume radicular e acúmulo de biomassa.

Para determinação do volume radicular, após a coleta, as raízes foram lavadas e colocadas para secar ao ar, sobre papel toalha. Em seguida, o volume radicular foi determinado através do deslocamento de volume de água em proveta graduada. As raízes foram totalmente submersas em um volume conhecido de água, de forma que a diferença entre o volume inicial e final foi considerado como o volume de raízes.

A massa de matéria seca de plantas foi determinada pelo método da estufa. As plantas (ou partes das plantas) foram coletadas e acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar, ajustada para uma temperatura de 50°C, até peso constante. Após isso, as amostras foram pesadas em balança semi-analítica. Quantificando o teor de matéria seca de raízes e parte aérea no experimento 1 e de raízes, folhas e colmo no experimento 2.

3.3.3 Teor de Nitrogênio

O teor de nitrogênio foi determinado nas plantas e no substrato, após o final do período de déficit hídrico. Para determinação da porcentagem de nitrogênio na

forma orgânica foi utilizado a metodologias Semi-microKjeldahl (TEDESCO et al., 1995). Esta técnica consiste na solubilização úmida, seguida por destilação a vapor e titulação, para a quantificação do teor de nitrogênio na forma orgânica. As amostras, após a secagem, passaram por moagem, em seguida pela digestão sulfúrica (H_2SO_4 + catalisadores) que transforma proteínas e aminoácidos do tecido vegetal em N^+NH_4 sendo destilado e complexado em ácido bórico com indicador misto, e titulado com solução padronizada de H_2SO_4 diluído (CARMO et al., 2000). Após titulado o valor de ácido utilizado foi convertido em porcentagem de nitrogênio e gramas de nitrogênio absorvidos.

Foram avaliados os teores de nitrogênio na parte aérea, sistema radicular e do substrato, para os experimentos 1 e 2.

3.4 Analise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$). Quando detectadas variações significativas, as médias foram contrastadas pelo teste t ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros referentes às trocas gasosas em plantas de milho foram influenciados pelos ambientes testados apenas no último dia de suspensão da irrigação (Tabela 1). No entanto os tratamentos aplicados às sementes não influenciaram os parâmetros citados. A interação ente os fatores não foi observada em nenhuma das avaliações.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as trocas gasosas, (valores de F) de plantas de milho, tratadas com Stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.

FV	Assimilação líquida de Carbono					Transpiração foliar				
	0 DSI	2 DSI	4 DSI	6 DSI	10 DSI	0 DSI	2 DSI	4 DSI	6 DSI	10 DSI
Bloco	1,45	7,03	7,71	0,68	1,54	2,59	7,06	7,25	1,49	1,23
Ambiente (A)	0,96 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,01 ^{ns}	3,38 ^{ns}	7,42 [*]	1,11 ^{ns}	1,68 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,82 ^{ns}	8,88 ^{**}
Tratamento (T)	0,25 ^{ns}	1,57 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,06 ^{ns}	1,25 ^{ns}
A x T	0,23 ^{ns}	2,14 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,04 ^{ns}	1,20 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,27 ^{ns}
CV%	23,06	29,06	21,53	29,18	33,26	27,61	19,82	22,12	34	29,28
Média	19,1	16,51	16,56	12,55	11,7	2,02	3,22	2,87	1,57	1,25
FV	Condutância Estomática					Concentração interna de carbono				
	0 DSI	2 DSI	4 DSI	6 DSI	10 DSI	0 DSI	2 DSI	4 DSI	6 DSI	10 DSI
Bloco	0,35	0,68	4,02	0,73	1,07	5,6	7,6	4,69	7,89	7,75
Ambiente (A)	1,41 ^{ns}	2,90 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,64 ^{ns}	9,63 ^{**}	0,11 ^{ns}	0,09 ^{ns}	1,26 ^{ns}	1,45 ^{ns}	0,18 ^{ns}
Tratamento (T)	0,84 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,43 ^{ns}	1,80 ^{ns}	0,22 ^{ns}	1,29 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,88 ^{ns}	0,46 ^{ns}
A x T	0,45 ^{ns}	2,31 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,83 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,14 ^{ns}
CV%	25,6	17,18	23,26	41,27	29,77	39,88	21,57	17,56	14,69	37,53
Média	0,12	0,16	0,12	0,11	0,07	120,57	218,37	147,44	200,6	139,81

FV: fonte de variação; DSI: nº de dias após a suspensão da irrigação; CV: Coeficiente de variação; ^{ns}: não significativo; ^{*} e ^{**} significativo p<0,05 e p<0,01, respectivamente, pelo teste F.

Conforme apresentado na Figura 2, as plantas apresentaram resposta à restrição hídrica apenas no último dia de avaliação. A resposta à falta de água pode ser observada através da redução da assimilação líquida de carbono, da condutância estomática e da transpiração foliar, como um efeito claro do fechamento estomático. Com a percepção da falta de água pelas raízes, há um incremento da síntese de ácido abscísico (ABA), o qual é translocado para as folhas, estimulando o rápido fechamento dos estômatos a fim de reduzir a transpiração (TAIZ; ZEIGER,

2010), estudos de Oliveira et al., 2002, Sena et al., 2004 e Santos et al., 2012 encontraram respostas semelhantes.

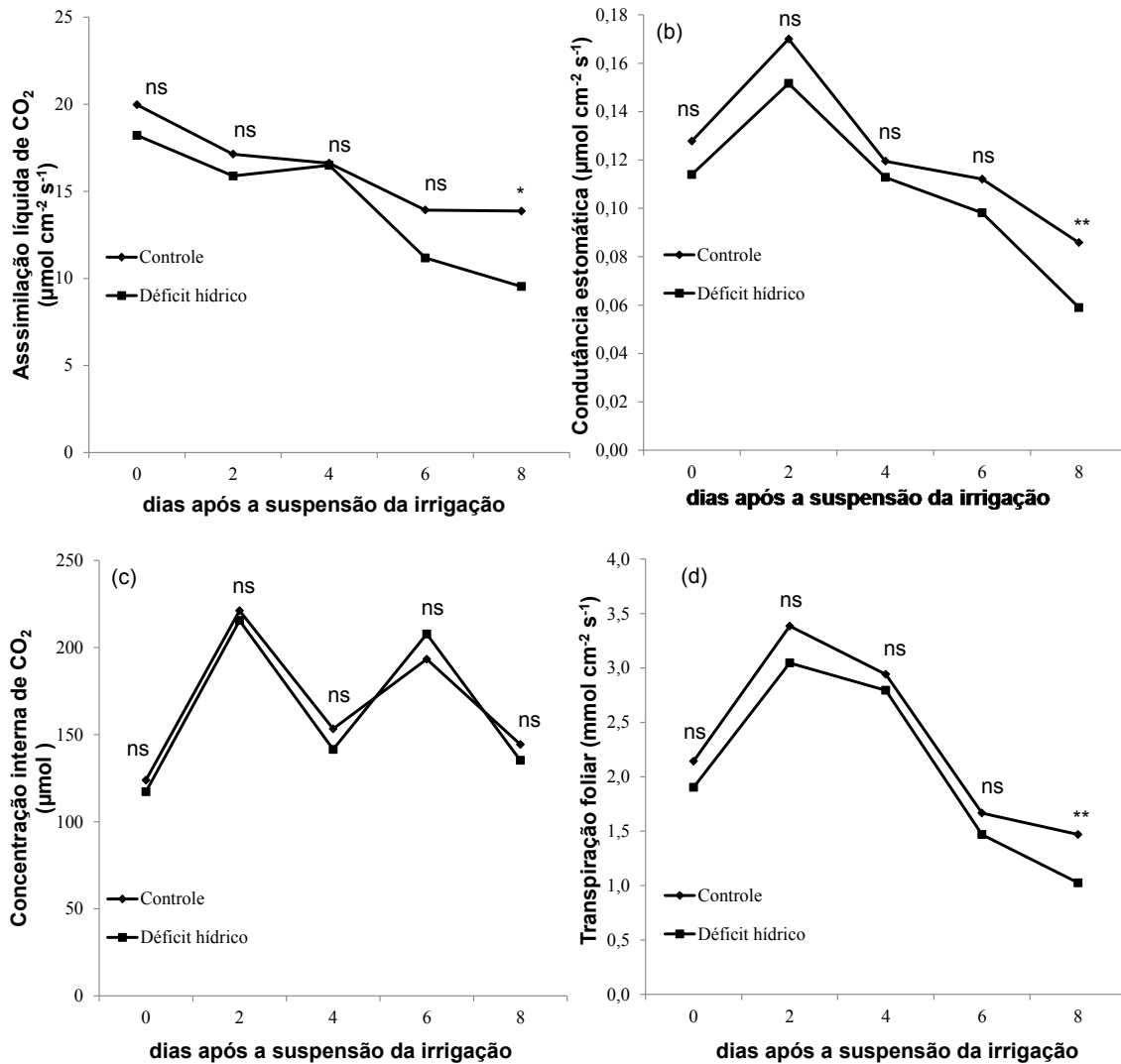


Figura 2. Comparação de médias para os valores de assimilação líquida de carbono (a), condutância estomática (b), concentração interna de CO₂ (c) e transpiração foliar (d), em plantas de milho submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. ns: não significativo; * e ** significativo p<0,05 e p<0,01, respectivamente.

A utilização de vermiculita expandida como substrato pode ter atrasado a percepção das plantas à falta de água, visto que a mesma possui alta capacidade de retenção de água. Isto era esperado, para que o déficit hídrico ocorresse de maneira

gradual, afim de melhor entender os efeitos das bactérias sobre as respostas da cultura em situação de estresse.

Para os parâmetros biométricos (Tabela 2) e para teores de nitrogênio (Tabela 3) avaliados, não houve efeito dos fatores de estudo para nenhuma das variáveis estudadas. A falta de respostas nos parâmetros biométricos avaliados, mesmo com diferença estatística na avaliação de trocas gasosas, pode ser explicado pelo curto período que houve diferença estatística na assimilação líquida de carbono e aos baixos índices fotossintéticos em ambos os tratamentos, ou seja, para o período onde o déficit hídrico efetivamente ocorreu.

A falta de diferença estatística no acúmulo de nitrogênio entre tratamentos (Tabela 3), com a utilização de um substrato inerte levanta a hipótese de que não houve fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias estudadas no presente trabalho. O uso deste tipo de substrato foi empregado para que o nitrogênio presente no solo, assim como os microorganismos edáficos não afetassem a análise. Desta forma, o aumento de N no solo ou nas plantas poderiam ser atribuídos aos efeitos da bactéria inoculada.

Tabela 2. Resumo da análise de variância (valores de F) para os caracteres biométricos de plantas de milho tratadas com Stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* e submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.

FV	VR(cm ³)	MSR(g)	MSPA(g)	MST(g)
Bloco	0,13	0,90	0,32	0,60
Ambiente (A)	0,06 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,21 ^{ns}
Tratamento (T)	1,08 ^{ns}	0,62 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,09 ^{ns}
A x T	0,14 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,1 ^{ns}	0,11 ^{ns}
CV%	1,59	25,11	38,39	27,84
Média	158,04	0,48	0,38	0,86

FV: fonte de variação; CV: Coeficiente de variação; VR: volume radicular; MSR: matéria seca de raiz; MSPA: matéria seca de parte aérea; MST: matéria seca total; ns: não significativo; * e ** significativo p<0,05 e p<0,01, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 3. Resumo da análise de variância (valores de F) para teores de nitrogênio de plantas de milho tratadas com Stimulate, inoculadas com *Azospirillum brasilense* submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.

FV	%NR	NR(mg)	%NPA	NPA(mg)	%NS
Bloco	2,34	1,35	4,62	2,05	1,18
Ambiente (A)	4,07 ^{ns}	1,58 ^{ns}	3,03 ^{ns}	0,86 ^{ns}	1,04 ^{ns}
Tratamento (T)	1,43 ^{ns}	1,06 ^{ns}	2,40 ^{ns}	1,27 ^{ns}	1,08 ^{ns}
A x T	0,09 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,99 ^{ns}
CV%	49,07	55,27	38,79	57,14	148,73
Média	2,11	9,84	3,25	12,10	0,79

FV: fonte de variação; CV: Coeficiente de variação; NR%: porcentagem de nitrogênio em raiz; NR: massa de nitrogênio em raiz; NPA%: porcentagem de nitrogênio na parte aérea; NPA: massa de nitrogênio na parte aérea; NS%: porcentagem de nitrogênio no substrato; ns: não significativo; * e ** significativo p<0,05 e p<0,01, respectivamente, pelo teste F.

Para a cultura do trigo, os parâmetros referentes às trocas gasosas foram influenciados pelos ambientes testados (Tabela 4). Porém, assim como para a cultura do milho (Tabela 1), os tratamentos aplicados às sementes não influenciaram os parâmetros citados. A interação entre os fatores também não foi observada em nenhuma das avaliações.

Tabela 4. Resumo da análise de variância para as trocas gasosas (valores de F) de plantas de trigo tratadas com Stimulate, inoculadas com *A. brasilense* e submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitibaanos (SC), 2014.

FV	Assimilação líquida de Carbono				Transpiração foliar			
	0DAE	4DAE	6DAE	8DAE	0DAE	4DAE	6DAE	8DAE
Bloco	5,07	19,65	20,92	12,08	6	38,52	27,08	16,87
Ambiente (A)	19,12 ^{**}	3,93 ^{ns}	26,65 ^{**}	15,31 ^{**}	12,51 ^{**}	6,03 [*]	36,52 ^{**}	14,61 ^{**}
Tratamento (T)	3,20 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,24 ^{ns}	1,38 ^{ns}	2,47 ^{ns}	1,84 ^{ns}
A x T	0,57 ^{ns}	0,56 ^{ns}	1,71 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,45 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,09 ^{ns}	2,64 ^{ns}
CV%	8,46	8,78	7,46	8,38	19,8	14,33	11,46	15,59
Média	23,17	34,86	21,33	22,66	7,19	7,12	5,94	5,96
FV	Condutância Estomática				Concentração interna de carbono			
	0DAE	4DAE	6DAE	8DAE	0DAE	4DAE	6DAE	8DAE
Bloco	1,01	9,97	8,3	4,33	3,46	1,6	5,87	13,01
Ambiente (A)	14,73 ^{**}	6,74 ^{ns}	40,90 ^{**}	25,24 ^{**}	4,75 [*]	3,41 ^{ns}	17,01 ^{**}	3,88 ^{ns}
Tratamento (T)	0,31 ^{ns}	0,96 ^{ns}	1,08 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,55 ^{ns}
A x T	0,62 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,11 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,78 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,72 ^{ns}
CV%	24,79	21,17	14,83	18,43	13,4	6,34	5,31	7,8
Média	0,35	0,52	0,34	0,56	256,61	260,28	261,54	318,58

FV: fonte de variação; CV: Coeficiente de variação; DAE: n° de dias após a suspensão da irrigação; ** significativo a 1; * significativo a 5%.

Conforme apresentado na Figura 3, as plantas de trigo apresentaram resposta à restrição hídrica, observada através da redução da assimilação líquida de carbono, da condutância estomática e da transpiração foliar. O fechamento parcial dos estômatos, observado através da diminuição da condutância estomática, e a queda na taxa de transpiração, mais rápida que a queda na fotossíntese, indica a existência de mecanismos de adaptação das plantas ao déficit de água no substrato (OLIVEIRA et al, 2002).

A utilização do substrato vermiculita + areia, aparentou ter uma redução mais rápida no teor de água, onde já na primeira avaliação apresentou diferença estatística entre ambientes, porém as condições climáticas, especialmente as baixas temperaturas e alta umidade relativa do ar (dados não apresentados), no período das avaliações amenizaram a intensidade do déficit hídrico.

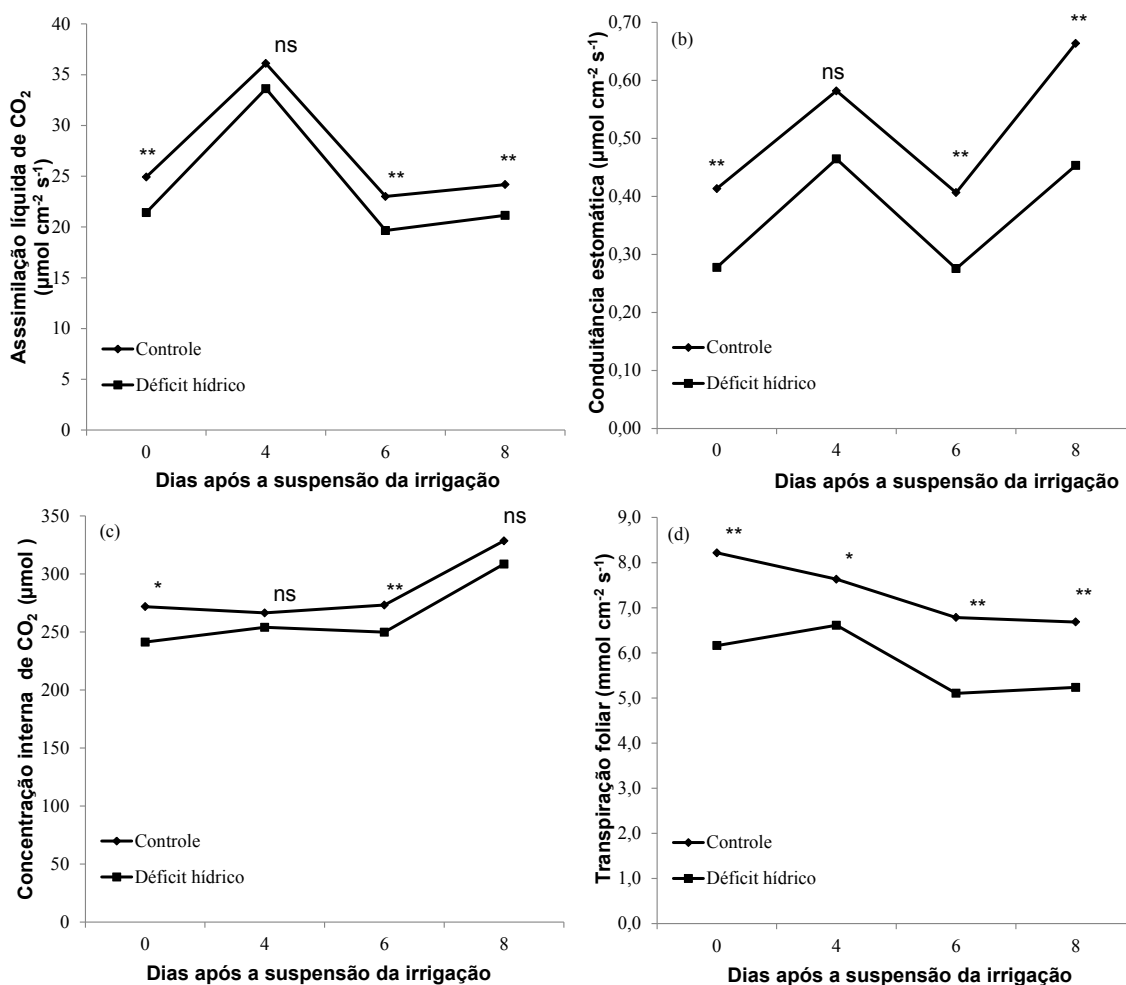


Figura 3. Comparação de médias para valores de assimilação líquida de carbono (a), condutância estomática (b), concentração interna de CO₂ (c), transpiração foliar (d), em plantas de trigo submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. ns: não significativo; * e ** significativo $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

A análise de variância para os parâmetros biométricos avaliados em plantas de trigo (Tabela 5) apresentou efeitos significativos a 1% para os ambientes testados, observando diferenças em matéria seca de raiz (MSR), matéria seca de colmo (MSC), matéria seca de folha (MSF) e matéria seca de parte aérea (MSPA).

Tabela 5. Resumo da análise de variância (valores de F) para os caracteres biométricos de plantas de trigo, tratadas com Stimulate, inoculadas com *A. brasilense* e submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.

FV	VR (cm ³)	MSR (g)	MSC (g)	MSF (g)	MSPA (g)	MST (g)
Bloco	3,02	0,27	4,98	14,72	9,45	2,67
Ambiente (A)	1,74 ^{ns}	8,37 ^{**}	5,17 [*]	10,83 ^{**}	8,24 ^{**}	1,62 ^{ns}
Tratamento (T)	2,80 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,49 ^{ns}
A x T	2,10 ^{ns}	1,35 ^{ns}	1,53 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,13 ^{ns}	1,95 ^{ns}
CV%	23,41	26,90	18,13	16,54	16,62	17,75
Média	16,54	1,42	0,58	0,53	1,12	2,54

FV: fonte de variação; CV: Coeficiente de variação; VR: volume radicular; MSR: matéria seca de raiz; MSC: matéria seca de colmo; MSF: matéria seca de folha; MSPA: matéria seca de parte aérea; MST: matéria seca total; ** significativos a 1%; * significativos a 5%.

Na Figura 4, observa-se que as plantas que passaram por déficit hídrico apresentaram redução no crescimento da parte aérea (4c, 4e), e aumentaram o desenvolvimento radicular (4a, 4b), não alterando a produção de matéria seca total (f). Esta resposta é uma estratégia para mitigar os impactos da falta de água (SANTOS; CARLESSO, 1998). Estudos de Da Costa et al. (2008) com maior intensidade de estresse hídrico, observaram um menor crescimento radicular nos tratamentos sob estresse, acarretado principalmente pela morte de raízes mais velhas. Assim, pode-se afirmar que quando o estresse hídrico tem baixa intensidade, e alta duração as planta conseguem minimizar os impactos deste, direcionando suas reservas para um maior crescimento radicular, o que é confirmado por Santos e Carlesso (1998). McCree e Fernández (1989) destacaram que o decréscimo da produção de área foliar, o fechamento estomático, a aceleração da senescência e a abscisão foliar como sendo as principais respostas de plantas ao déficit hídrico.

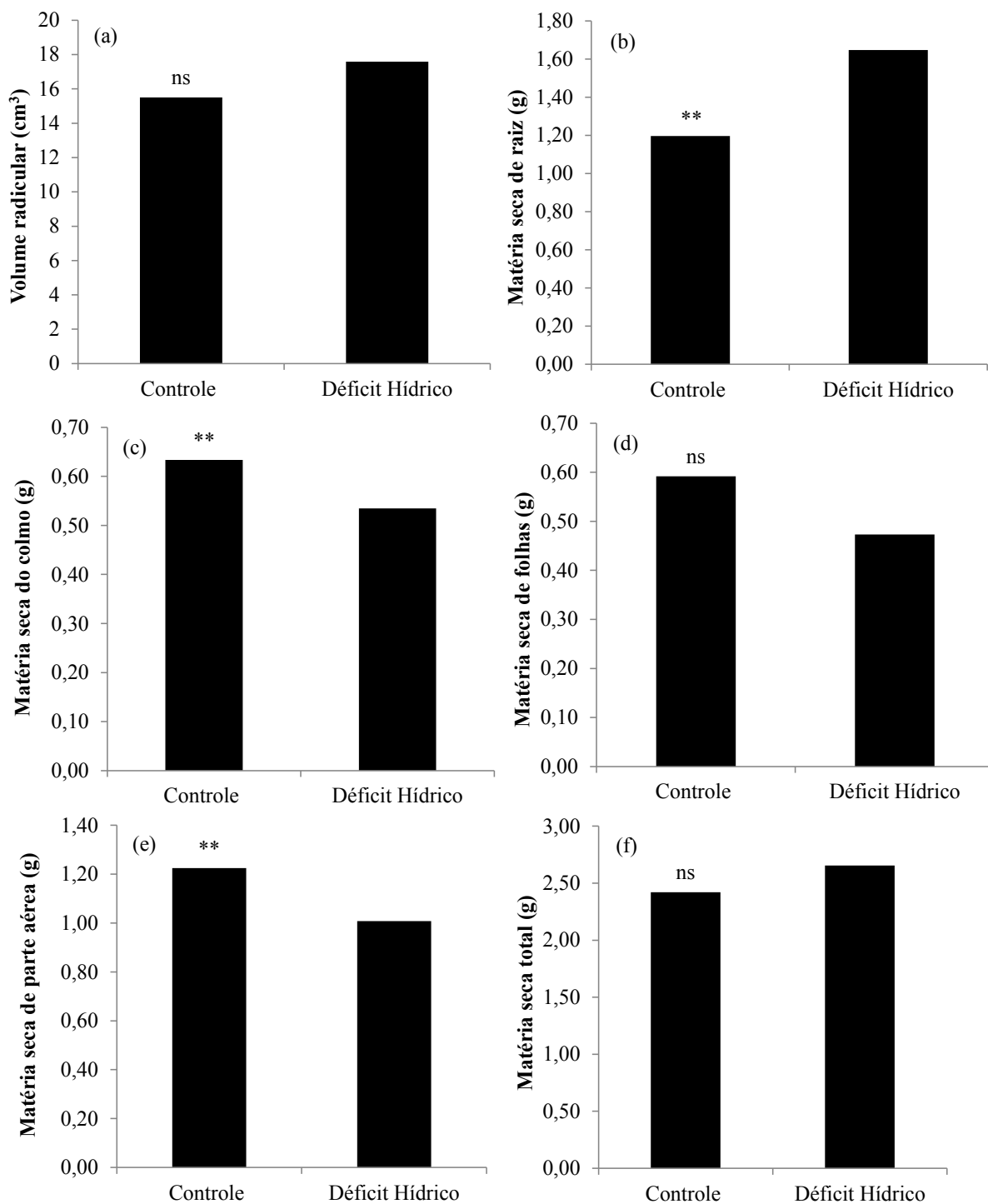


Figura 4. Comparação de médias para os valores biométricos, volume radicular (a), matéria seca de raiz(b), matéria seca de colmo (c), matéria seca de folha (d), matéria seca de parte aérea (e), matéria seca total (f), em plantas de trigo submetidas a déficit hídrico em casa de vegetação. ns: não significativo; * e ** significativo $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente.

Não houve efeito dos fatores de estudo para teores de nitrogênio (Tabela 6). Contudo, vale ressaltar que esta avaliação apresentou coeficientes de variação elevados, que podem estar prejudicando a análise dos resultados.

Tabela 6. Resumo da análise de variância (valores de F) para teores de nitrogênio, de plantas de trigo, tratadas com Stimulate, inoculadas com *A. brasilense* e submetidas à déficit hídrico em casa de vegetação. Curitiba (SC), 2014.

	%NR	NR(mg)	%NPA	NPA(mg)	%NS
Bloco	2,77	1,89	0,52	0,57	0,75
Ambiente (A)	0,11 ^{ns}	2,60 ^{ns}	0,40 ^{ns}	1,20 ^{ns}	0,82 ^{ns}
Tratamento (T)	0,21 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,46 ^{ns}
A x T	0,81 ^{ns}	2,90 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,67 ^{ns}
CV%	40,64	49,01	92,47	85,02	29,41
Média	1,41	20,10	3,15	33,70	0,49

NR%: porcentagem de nitrogênio em raiz; NR: gramas de nitrogênio em raiz; NPA%: porcentagem de nitrogênio na parte aérea; NPA: gramas de nitrogênio de parte aérea; NS%: porcentagem de nitrogênio no substrato; ns: não significativo; ** significativo a 1%; * significativo a 5%.

Castro et al. (1998), destacaram que o Stimulate® incrementa o crescimento e o desenvolvimento vegetal estimulando a divisão celular, a diferenciação e o alongamento das células, também aumenta a absorção e a utilização dos nutrientes. Estudos a campo de Dourado Neto et al. (2004) concluíram que o tratamento de sementes de milho com Stimulate aumentou o rendimento de grãos, diâmetro do colmo e número de grãos por fileira da espiga. Porém, no presente estudo não foram observadas nenhuma alteração, nos parâmetros avaliados, nos tratamentos contendo Stimulate®.

A inoculação com *A. brasilense*, no presente estudo não influenciaram os caracteres biométricos, o que concorda com estudos feitos a campo, por Didonet et al. (1996), Didonet et al. (2000), e Gitti et al. (2012). Porém discorda de Perin et al. (2003), que observou aumento de massa radicular e massa fresca da parte aérea nos tratamentos com inoculação com *Azospirillum*, avaliando plântulas em laboratório. Rodrigues et al. (2014) observou maior matéria seca em folhas de trigo em plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* em cultivo protegido. De Quadros et al. (2014), avaliou em condições de campo, híbridos de milho, inoculados, com espécies de *Azospirillum* e observou que a inoculação estimulou o

desenvolvimento das plantas no período vegetativo. Dartora et al. (2013) em condições de campo observou incrementos em matéria seca com a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Dos Reis Junior et al. (2008) em casa de vegetação observaram diferença em massa seca de raiz. Campos et al. (1999), encontraram respostas negativas a produção de matéria seca em trigo e aveia inoculadas com *Azospirillum* em experimentos a campo testando um inoculante comercial.

Não foi observado diferenças estatísticas para os teores de nitrogênio (Tabela 3 e Tabela 6), o que concorda com os trabalhos de Didonet et al. (1996), Didonet et al. (2000), Campos et al. (1999) e Gitti et al. (2012).

A fixação biológica de nitrogênio por *A. brasilense* é relatada em uma série de estudos (RADWAN et al., 2005; HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2007; HUERGO, 2008; DOS REIS JUNIOR et al., 2008; MOREIRA, 2010; HUNGRIA, 2011), assim como a produção de estímulos responsáveis por melhorar o desenvolvimento vegetal, de maneira direta, através da produção de hormônios como auxinas, citocininas e giberelinas (TIEN et al., 1979; BOTTINI et al., 1988; REIS JUNIOR et al., 2004; RADWAN et al., 2005; BARASSI et al., 2008; DARTORA et al., 2013) e de maneira indireta estimulando a produção de hormônios como ácido jasmônico por plantas inoculadas (BELLONE; BELLONE, 2008; CASÁN et al., 2013). Porém na prática o que temos é inconsistência de resultados, problema esse relatado por Reis (2007), como sendo o maior obstáculo para a utilização de *Azospirillum* em gramíneas.

Por mais que estudos *in vitro* confirmem o potencial do *A. brasilense* em produzir hormônios vegetais, se faz necessário mais estudos, que comprovem ou não a efetividade desses na promoção do crescimento vegetal. Pois a simples produção de hormônios vegetais, não garante a absorção e muito menos se serão funcionais, favorecendo o metabolismo vegetal a campo.

A falta de padrões nas respostas com a inoculação com *Azospirillum*, pode estar ligada ao fato da interação entre bactéria e hospedeiro ser associativa, a não formação de estruturas organizadas e a bactéria não depender da planta hospedeira para sobreviver (MOREIRA, 2010; HUNGRIA, 2011), o que torna esta interação sensível a variações na relação entre solo, clima, planta e bactéria (GYANESHWAR et al., 2002; DOBBELAERE et al., 2002; DE QUADROS et al. 2014). São

necessários mais estudos com objetivo de entender as interações entre *Azospirillum* e gramíneas tornando mais claro seus efeitos, tornando possível medidas de adequações em seu uso agronômico.

5 CONCLUSÃO

A biomassa e o acúmulo de nitrogênio em plantas de milho e trigo não são afetados pela inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, independente da disponibilidade de água em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- AWIKA, J. M. Major Cereal Grains Production And Use Around The World. In: AWIKA, J. M.; PIIRONEN, V.; BEAN, S. (eds.) *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion*. Washington: ACS Symposium Series: American Chemical Society, v.1089, p.1-13, 2011.
- BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.***: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, p.49-59, 2008.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, Rio de Janeiro , v. 77, n. 3, p. 549-579, Sept. 2005.
- BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C. Inoculaciones com *Azospirillum brasilense* em Producciones Agrícolas Del Noa. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.***: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.239-250, 2008.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PHARIS, R. P. Identification of Gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiol.** V. 90, P. 45-47, 1989.
- CAMPOS, B. C.; THEISEN, S. ; GNATTA, V. Inoculante Graminante nas culturas de trigo e aveia.. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, p. 401-407, 1999.
- DO CARMO, C. A. F. S.; ARAUJO, W. S. A.; BERNARDI, A. C. C.; SALDANHA, M. F. C. **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2000 (Circular Técnica).
- CASÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulators**, v.32, n. 3, p. 619-649, 2013.
- COSTA, J. R.; PINHO, J. L. N.; PARRY, M. M. Produção de matéria seca de cultivares de milho sob diferentes níveis de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** (Impresso), v. 12, p. 36-43, 2008.
- CASTRO, P. R. C.; PACHECO, A. C.; MEDINA, C. L. Efeitos de Stimulate e de micro-citros no desenvolvimento vegetativo e na produtividade da laranja pêra (*Citrus sinensis* L. osbeck). **Scientia Agrícola**, v. 55, n. 2, p. 338-341, 1998.
- COELHO, A. M.; CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Desafios para a obtenção de altas produtividades de milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 2004.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1023-1029, 2013.

DE QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F. da; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho Agronômico a Campo de Híbridos de Milho Inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, p. 209-218, 2014.

DIDONET, A. D.; Kenner, M.H.; RODRIGUES, O. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasil, v. 31, p. 645-651, 1996.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; Lima, O.S. ; Candaten, A. A. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasil, v. 35, p. 401-411, 2000.

DINIZ, S. P. S. S. Bioquímica da Fixação do Nitrogênio. Fixação Biológica do Nitrogênio, 2011. Disponível em: <http://goo.gl/86zvcl>. Acesso em 20/06/2015.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. NEWTON W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.) INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, vol. 2. Proceedings... Pullman, Washington State University Press, USA, p. 518- 538, 1976.

DOBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p 1464-1473, 1976.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JÚNIOR, P. A.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N.; BONNECARRÈRE, R. A. G.; CRESPO, P. E. N. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia** (Uruguaiana), Uruguaiana, v. 11, n.1, p. 93-102, 2004.

ESPINDULA M. C.; ROCHA, V.S.; DE SOUZA, L. T.; DE SOUZA, M. A.; GROSSI, J. A. S. Efeitos de reguladores de crescimento na elongação do colmo de trigo. **Acta Scientiarum**. Agronomy, Maringá, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

GITTI, D. C.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D.C.D.C.; RODRIGUES, R. A. F.; KANEKO, F.H. Coberturas vegetais, doses de nitrogênio e inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* em arroz de terras altas no sistema plantio direto. **Bragantia**, São Paulo, SP, v. 71, p. 509-517, 2012.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant Soil**, v.245, p.83-93, 2002.

HIRAKURI, M. H. **Avaliação Econômica da Produção de Trigo nos Estados do Paraná e de Santa Catarina, para a safra 2012**. Circular técnica Embrapa 92, Londrina, 2012.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.17-35, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007 (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; **Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 20p, 2011.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V. M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n.6, p. 961-970, 1998.

McCREE, K.J.; FERNÁNDEZ, C.J. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. **Crop Science**, Madison, v.29, p.353-360, 1989.

MONTEIRO, J. E. Agrometeorologia dos Cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola. Cap. 16 Trigo/ Cunha, G. R., et al., EMBRAPA 2009.

MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F., Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** (Online), v. 1, p. 74-99, 2010.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C.; NUNES, F. S. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova** (Impresso), v. 26, n.6, p. 872-879, 2003.

OLIVEIRA, M. A. J.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A.; DOMINGOS, J. R. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob condição hídrica. **Scientia Agricola**, Piracicaba_SP, v. 59, n.2, p. 59-63, 2002.

PAVINATO, P. S.; CERETTA, C. A.; GIROTTO, E.; MOREIRA, I. C. L. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. **Ciência Rural**, v. 38, p. 358-364, 2008.

PERIN, L.; SILVA, M. F. ; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia** (UFRRJ), Seropédica-RJ, v. 37, n.2, p. 47-53, 2003.

PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. da. **Trigo no Brasil: Bases para produção competitiva e sustentável**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n.10, p. 997-1004, 2005.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação Biológica de Nitrogênio - Estado da Arte. In: Adriana Maria de Aquino; Renato Linhares de Assis. (Org.). **Processos Biológicos do Sistema Solo-Planta**. 1ed. Brasília: SPI, Embrapa, v. 1, p. 151-180, 2005.

REIS JUNIOR, F. B.; da SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S. ; REIS, V. M. Identificação de Isolados de *Azospirillum amazonense* Associados a *Brachiaria* spp., em Diferentes Épocas e Condições de Cultivo e Produção de Fitormônio pela Bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

RIBEIRO, D. Processo de Haber-Bosch. **Revista de Ciência Elementar**, v. 1, n. 1, 2013.

RODRIGUES, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B. da; PINTO JUNIOR, A. S.; Klein, J.; COSTA, A. C. P. R. da. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 31-37, 2014.

ROSCOE, R.; MIRANDA, R. de A. S., Fixação Biológica de Nitrogênio e Promoção de Crescimento em Milho Safrinha. In **Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno**, p. 38-44, 2013.

SANTOS, D. dos; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; FIOREZE, S. L.; MACEDO JUNIOR, E. K Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** (Impresso), v. 16, p. 836-842, 2012.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológico das plantas. . **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 2, n.3, p. 287-294, 1998.

SENA, J. O. A.; LABATE, C. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Caracterização fisiológica da redução de crescimento de mudas de citros micorrizadas em altas doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 05, p. 827-832, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E, **Fisiologia vegetal**, 4 ed. Porto Alegre, Artmed, 2009 848 p.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology, v.37, p.1016-1024, 1979.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre, Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5)